

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ALBERTO STEFANELLI

**L'effetto biologico delle elevate pressioni idrostatiche.  
Realizzazione di alcuni apparecchi per l'osservazione  
diretta del materiale**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 52 (1972), n.4, p. 569-572.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1972\\_8\\_52\\_4\\_569\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_4_569_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



**Biologia.** — *L'effetto biologico delle elevate pressioni idrostatiche. Realizzazione di alcuni apparecchi per l'osservazione diretta del materiale* (\*). Nota del Socio ALBERTO STEFANELLI (\*\*).

SUMMARY. — Experimental data of Marsland and Pease on the inhibitory effects of hydrostatic pressure (about 300–400 atm.) on cell division, as observed in segmenting eggs of a number of animal species, prompted me to investigate the process of embryonic morphogenesis in which cell division is brought about along with cell degeneration and movements, by means of this technique. To this aim I devised three pressurized chambers: two of them allow for direct observation of specimens, one being suitable for pressure values up to 600 atm., the other for values up to 1500 atm., while in the third chamber it is possible to fix specimens under pressure, either by means of a fixative, or by freezing them.

L'effetto dell'alta pressione idrostatica è stata oggetto di molte ricerche nel campo della biologia, sia per la sua azione diretta sui viventi, sia per le alterazioni che vengono provocate a livello macromolecolare e colloidale.

Possiamo considerare due ordini di pressione idrostatica: a) le pressioni che sono riscontrabili nella biosfera che vanno dalla 1 atmosfera di pressione del livello del mare alle 1000 atmosfere circa nel fondo delle fosse oceaniche; b) le pressioni oltre questi valori naturali.

Materiale vivente è stato sottoposto sino a 15.000 atm. e sostanze organiche macromolecolari sino a 20.000 atm. Queste elevate pressioni sono state realizzate con due diversi procedimenti: con la compressione mediante martinelli idraulici; con l'elevata centrifugazione. È evidente il diverso risultato applicando i due metodi sul materiale biologico (1). Con la centrifugazione infatti si determinano spostamenti interni corrispondenti al diverso peso specifico dei vari costituenti e questo metodo può essere utilmente impiegato proprio a questo scopo. Di maggior interesse biologico è il metodo della pressurizzazione con martinetto idraulico.

La scoperta di organismi viventi sin nel più profondo delle fosse oceaniche ci ha resi edotti che sino alla pressione di circa 1000 atmosfere la vita è compatibile ed è anzi interessante lo studio degli specifici adattamenti a queste peculiari condizioni. Vanno ricordate a questo proposito le pionieristiche osservazioni di P. Regnard (1884–1891) e quelle recentissime di Flügel e Schlieper (1970) a cui rimando per la bibliografia sull'argomento [1].

Un problema è quello dei meccanismi di adattamenti degli organismi abissali nel senso ecologico di « fitness »; un problema è quello della possibilità di sopravvivenza a forti pressioni di organismi che vivono di norma

(\*) Con un contributo del C.N.R.

(\*\*) Presentata nella seduta dell'8 aprile 1970.

(1) La prima è pressione *statica* che agisce sull'oggetto in tutte le direzioni; la seconda è *dinamica* e agisce secondo la direttrice centrifuga.

alla pressione atmosferica. In fine un problema è quello della possibilità di sopravvivenza a pressioni superiori a quelle riscontrabili nella biosfera, stabilendone i limiti.

Un ostacolo non indifferente a queste ricerche è di natura puramente tecnica poiché le pressioni così elevate, quali quelle a cui ho accennato, sono possibili solo in ambienti assai limitati (pochi  $\text{mm}^3$ ) ed è assai difficile, soprattutto alle alte pressioni, permettere un rinnovamento dei liquidi in modo idoneo alla ossigenazione e alla eliminazione dei cataboliti. Pertanto si può operare solo su forme minute e per breve periodo di tempo. In fine, per poter seguire il comportamento dell'oggetto biologico, è necessaria l'osservazione diretta dentro la camera di compressione con possibilità di fotografare o cinematografare le fasi dell'esperimento. E utile sarebbe anche poter fissare, per l'esame istologico, il materiale in compressione.

Lo studio di reazioni chimiche ad elevata pressione ha permesso di trarre delle importanti conclusioni sull'effetto della pressione introducendo la pressione nella equazione di Arrhenius nel contesto della moderna teoria della *absolute reaction rate* formulata da Eyring, 1935; Wynne-Jones e Eyring, 1935; Polany e Evans, 1935; Glasstone *e coll.*, 1941.

In sintesi la velocità di reazione non è solo in rapporto con la temperatura, ma anche con la pressione così che la velocità di una reazione rimane costante abbassando la temperatura ed elevando la pressione o viceversa. È risultato infine che la pressione inibisce le reazioni che portano ad aumento di volume, favorisce quelle che portano a diminuzione di volume, non agisce in quelle in cui non vi è variazione volumetrica.

L'effetto della pressione si può predire in base alle leggi termodinamiche classificando le reazioni secondo la loro relazione energia-volume. Le reazioni che liberano energia (esergoniche) portano in genere a riduzione di volume e possono verificarsi anche in assenza di fonti di energia. Lo stato di equilibrio di questi sistemi è spostato indietro da aumento di temperatura e in avanti da aumento di pressione e l'effetto della pressione è relativo alla diminuzione di volume, come è stato dimostrato per certe forme di gelazione (Marsland e Brown, 1942). Nelle reazioni endergoniche (che assorbono energia) si ha in genere aumento di volume del sistema e occorre pertanto energia perché si attuino agendo contro la pressione ambiente. In questo caso l'aumento di temperatura sposta il sistema verso lo stato di gel e aumentando la pressione verso lo stato di sol. La pressione è pertanto inibente. Altri sistemi di interazione appaiono invece indifferenti alle alte pressioni. Sono reazioni isoergoniche con variazioni minime di volume; esse sono indifferenti sia a variazioni di temperatura che di pressione (Freundlich, 1937) [2].

Ricordo come in queste ricerche sia stato di grandissima utilità lo studio della bioluminescenza in quanto l'entità di emissione di luce è servita come indicatore naturale ed istantaneo della velocità della reazione (Brown *e coll.*, 1942; Eyring e Magee, 1942; Johnson *e coll.*, 1942, 1954, 1954; McElroy, 1943).

L'effetto della pressione appare evidente su molte sostanze macromolecolari, di enorme importanza biologica, quali gli acidi nucleici, gli enzimi

e altre proteine soggette, nella loro attività, a sensibili variazioni di volume molecolare, come ad esempio nella polimerizzazione e nella depolimerizzazione. In genere nella denaturazione delle proteine si hanno contrazioni volumetriche del  $100 \text{ cm}^3/\text{mol}$  (Johnson e coll., 1954) [3]. Questo spiega perché le alte pressioni idrostatiche, da 5000 a 15000 atm, provochino la denaturazione delle proteine.

Le ricerche sin ora compiute su organismi soggetti ad elevate pressioni (dell'ordine di 200–600 atm) hanno dimostrato vari effetti, ma tra questi, per i problemi di mio peculiare interesse e cioè quelli che riguardano la morfogenesi, ricordo l'effetto bloccante della divisione cellulare (Marsland e coll.) [4] nella segmentazione dell'uovo e, a pressioni più elevate, l'effetto inibente della motilità cellulare agendo sui sistemi gelificati dei pseudopodi, delle ciglia e dei flagelli.

Ritenendo pertanto l'impiego delle alte pressioni uno strumento utile per le indagini della embriologia sperimentale, ho messo a punto tre camere di pressurizzazione di cui due adatte per la osservazione macro e microscopica del materiale in esperimento ed una idonea al fissaggio per la preparazione istologica del materiale sotto pressione.

Mi limito in questa Nota ad una breve illustrazione dei tre apparecchi da me ideati e realizzati.

Il primo apparecchio, illustrato in A della Tav. I, permette osservazioni del materiale sottoposto a pressione sino a 600 atm. L'apparecchio è costruito in acciaio inossidabile e le guarnizioni sono del tipo O-ring. Le finestre di osservazione hanno un diametro di cm 2,5. La camera di pressurizzazione ha un volume di circa  $235 \text{ mm}^3$  ed è limitata da due dischi di perspex o di cristallo temperato di 10–15 mm di spessore. I due vetri sono tenuti distanti da un anello di neoprene di circa 3 mm. Un rubinetto ed un manometro uniti alla camera permettono di separarla dal martinetto e di controllare l'andamento della pressione interna. La camera può essere montata su un microscopio dritto o rovesciato usando obiettivi a lunga focale (Leitz UM).

La seconda camera illustrata in B Tav. I è costruita in modo da permettere pressioni assai più elevate, sino a 1500 atm. Ciò però è a scapito delle dimensioni delle finestre di osservazione che sono state ridotte ad un diametro di 3 mm.

La terza camera (Tav. II) è realizzata in modo da permettere la fissazione del materiale biologico sotto pressione. Non è però possibile l'osservazione diretta del materiale.

La camera di pressurizzazione di forma cilindrica è collegata al manometro e al rubinetto con un lungo tubicino così da poter immergerla in un liquido refrigerante (Tav. II A). Nell'interno del cilindro, come è visibile in C è alloggiato un contenitore in teflon (3) che viene chiuso da un pistone (6). Il contenitore (Tav. II B) è svitabile in tre settori; un alloggiamento per il materiale biologico (in alto nella figura) è separato da un diaframma rappresentato da un vetrino sottile da uno scompartimento più grande in cui si pone il fissativo e in cui è immersa la massa battente (4) destinata a rompere

il vetrino. Il tutto è chiuso da un coperchietto. Il fondo del contenitore e del coperchietto sono sottili e flessibili per permettere che la pressione esterna si trasmetta all'interno del contenitore. Per fissare il materiale è sufficiente capovolgere l'apparecchio così che la massa battente batta sul vetrino rompendolo. Nella realizzazione di questo dispositivo di rottura dei vetrini mi sono ispirato ad una camera di compressione realizzata da Landau e Thibodean (1952) [5] per lo studio della substruttura dell'ectoplasma di amebe sottoposte a circa 500 atm.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] FLÜGEL H. e SCHLIEPER C., *The effect of pressure on marine invertebrates and fishes. High pressure effects on cellular processes*, «Cell. Biol. Monographs», Ac. Press. (1970).
- [2] FREUNDLICH H., *Some recent work on gels*, «J. Phys. Chem.», 41, 901-320 (1927).
- [3] JOHNSON F.H., EYRING H. e POLISSAR M.J., *The kinetic basis of molecular biology*. Wiley, N.Y. (1954).
- [4] MARSLAND D., *Pressure-temperature studies on the mechanisms of cell division*. In «High pressure effects on cellular processes», «Cell. Biol. Monographs», Ac. Press (1970).
- [5] LANDAU J.V. e THIBODEAN L., *The micromorphology of Amoeba proteus during pressure induced changes in the sol-gel cycle*, «Exp. Cell Res.», 27, 591-594 (1962).

#### SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

##### TAVOLA I

Camere di pressurizzazione che permettono l'osservazione diretta del materiale biologico in esperimento. A camera sino a 600 atm; B camera sino a 1500 atm.

1 camera; 2 boccola di raccordo con il martinetto; 3 vetri e anello di gomma limitante lo spazio per il materiale; 4 tappo di chiusura con guarnizioni o-ring; 5 piastra di bloccaggio; 6 rubinetto.

##### TAVOLA II

Camera di compressione con possibilità di fissaggio del materiale sotto pressione con refrigerazione e con fissativo.

1 camera; 2 stelo di raccordo col manometro e il rubinetto; 3 contenitore in teflon; 4 massa battente; 5 diaframma di vetro sottile tra lo scompartimento col materiale e quello col fissativo; 6 tappo di separazione tra la camera con il contenitore e l'olio del sistema idraulico; 7 viti di chiusura; 8 chiave di serraggio della vite. Tutte le parti metalliche sono di acciaio inossidabile.



